



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **03200797 A**(43) Date of publication of application: **02 . 09 . 91**

(51) Int. Cl.

C07K 13/00**C12N 15/31****// C12P 21/02****(C12N 15/31 , C12R 1:19) , (C12P
21/02 , C12R 1:19)**(21) Application number: **01135781**(22) Date of filing: **31 . 05 . 89**(71) Applicant: **KAJI AKIRA**(72) Inventor: **KAJI AKIRA**(54) **NEW PEPTIDE AND NEW DNA**

objective peptide expressed by the formula.

(57) Abstract:

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

NEW MATERIAL: A peptide having an amino acid sequence expressed by the formula.

USE: A protein synthesis promoter for promoting elimination of a ribosome from mRNA in synthesizing a protein by *Escherichia coli*.

PREPARATION: For example, a gene capable of coding a peptide (RRF) expressed by the formula is collected from regions 2 to 6 in linking F-pili of *Escherichia coli* to carry out treatment with a restriction enzyme. The resultant gene is then linked to an expression vector prepared by treating a plasmid proliferative in the *Escherichia coli* with a restriction enzyme to provide a recombinant plasmid, which is then inserted into a host such as the *Escherichia coli* to carry out transformation. The obtained transformant is subsequently cultured using a high phosphoric acid-casamino acid culture medium, etc. After completing the culturing, the *Escherichia coli* is ultrasonically crushed and centrifuged to collect a supernatant as a water-soluble fraction. DNA, RNA, etc., are precipitated and removed to collect a crude fraction by precipitation with ammonium sulfate. The collected fraction is then subjected to chromatography and purified to afford the

```

MetIleSerAspIleArgLysAspAlaGluValArgMetAsp
LysCysValGluIlePheLysThrGluIleSerLysIleArg
ThrGlyArgAlaSerProSerLysLysAspGlyIleValVal
GluThrThrGlyThrProThrProLysArgGluLysIleSer
ValThrValGluAspSerArgThrLysLysIleValPhe
AspArgSerMetSerPheAlaValGluLysIleValMetAla
SerAspLysGluLysLysProAspSerAlaGlySerAspIle
ArgValProLysProProLysThrGluGluThrArgLysAsp
LysThrLysIleValArgGlyGluAlaGluGluArgVal
AlaLysArgAspValArgArgAspAlaLysAspLysValLys
AlaLysLysLysAspLysGluIleSerGluAspAspArg
ArgSerGluAspAspValGluLysLysThrAspAlaValIle
LysLysIleGluAlaIleLysAlaLysLysGluAlaGluLys
MetGluPhe

```

⑫ 公開特許公報 (A) 平3-200797

⑬ Int. Cl.¹

C 07 K 13/00
C 12 N 15/31
// C 12 P 21/02
(C 12 N 15/31
C 12 R 1:19)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:19)

識別記号

ZNA

庁内整理番号

8619-4H

⑭ 公開 平成 3 年 (1991) 9 月 2 日

C

8214-4B

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全 5 頁)

⑮ 発明の名称 新規ペプチドならびに新規 DNA

⑯ 特 願 平1-135781

⑰ 出 願 平1 (1989) 5 月 31 日

⑱ 発 明 者 梶

昭 東京都東久留米市大門町 1-1-9

⑲ 出 願 人 梶

昭 東京都東久留米市大門町 1-1-9

① 明 細 書

1. 発明の名称

新規ペプチドならびに新規 DNA

2. 特許請求の範囲

(1) 下記のアミノ酸配列

MetIleSerAspIleArgLysAspAlaGluValArgMetAsp
LysCysValGluAlaPheLysThrGlnIleSerLysIleArg
ThrGlyArgAlaSerProSerLeuLeuAspGlyIleValVal
GluTyrTyrGlyThrProThrProLeuArgGlnLeuAlaSer
ValThrValGluAspSerArgThrLeuLysIleAsnValPhe
AspArgSerMetSerProAlaValGluLysAlaIleMetAla
SerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspIle
ArgValProLeuProProLeuThrGluGluArgArgLysAsp
LeuThrLysIleValArgGlyGluAlaGluGlnAlaArgVal
AlaValArgAsnValArgAspAlaAsnAspLysValLys
AlaLeuLeuLysAspLysGluIleSerGluAspAspArg
ArgSerGlnAspAspValGluLysLeuThrAspAlaAlaIle
LysLysIleGluAlaAlaLeuAlaAspLysGluAlaGluLeu
MetGlnPhe

からなる新規ペプチド。

(2) 下記のアミノ酸配列

MetIleSerAspIleArgLysAspAlaGluValArgMetAsp
LysCysValGluAlaPheLysThrGlnIleSerLysIleArg
ThrGlyArgAlaSerProSerLeuLeuAspGlyIleValVal
GluTyrTyrGlyThrProThrProLeuArgGlnLeuAlaSer
ValThrValGluAspSerArgThrLeuLysIleAsnValPhe
AspArgSerMetSerProAlaValGluLysAlaIleMetAla
SerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspIle
ArgValProLeuProProLeuThrGluGluArgArgLysAsp
LeuThrLysIleValArgGlyGluAlaGluGlnAlaArgVal
AlaValArgAsnValArgAspAlaAsnAspLysValLys
AlaLeuLeuLysAspLysGluIleSerGluAspAspArg
ArgSerGlnAspAspValGluLysLeuThrAspAlaAlaIle
LysLysIleGluAlaAlaLeuAlaAspLysGluAlaGluLeu
MetGlnPhe

からなるペプチドをコードする新規 DNA。

(3) 下記のアミノ酸配列

MetIleSerAspIleArgLysAspAlaGluValArgMetAsp
LysCysValGluAlaPheLysThrGlnIleSerLysIleArg
ThrGlyArgAlaSerProSerLeuLeuAspGlyIleValVal

GluTyrThrGlyThrProThrProLeuArgGlnLeuAlaSer
ValThrValGluAspSerArgThrLeuLysIleAsnValPhe
AspArgSerMetSerProAlaValGluLysAlaIleMetAla
SerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspIle
ArgValProLeuProProLeuThrGluGluArgArgLysAsp
LeuThrLysIleValArgGlyGluAlaGluGlnAlaArgVal
AlaValArgAsnValArgArgAlaAsnAspLysValLys
AlaLeuLeuLysAspLysGluIleSerGluAspAspAspArg
ArgSerGlnAspAspValGlnLysLeuThrAspAlaAlaIle
LysLysIleGluAlaAlaLeuAlaAspLysGluAlaGluLeu
MetGlnPhe

からなるペプチドをコードする新規DNAが

5'-GTGATTACCGATATCAGAAAACATGCTGAAGTACCGCATG
GACAAATCCGTACAGACCGTTCAAAACCCAAATACGCAAAATA
CCACACGGGTCTGCTCTTCTCCGACGCTGCTGGATGGCATTTGTC
GTGCAATTATTACGGCACCGGACGCGCGCTGCGTCACTGGCA
AGCGTAACCGTAGAAGATTCCGCTACACTGAAAATCAACGTG
TTGATCGTTCAATGTTCTCCGCGCGTTGAAAAACGATTAATG
CGCTCCGATCTGGCGTGAACCCGAACTCTCGCGGTACGAC
ATCCGTGTTCCGCTGCCCGCTGACGGAAGAAGCTCGTAA

本発明者は、既に、本発明者等が報告したアッセイ方法並びに精製方法(Biochemistry, 11, 4037-4044(1972))により、その活性を確かめながら、精製し、8残部分のアミノ酸配列を分析し、そのアミノ酸配列を基に、DNAプローブを合成し、大腸菌の遺伝子バンクよりスクリーニングし、適当なベクターに組み込み、大腸菌で発現させることに成功し、本発明のペプチドを提供するに至った。

即ち、本発明は、下記のアミノ酸配列

MetIleSerAspIleArgLysAspAlaGluValArgMetAsp
LysCysValGluAlaPheLysThrGlnIleSerLysIleArg
ThrGlyArgAlaSerProSerLeuLeuAspGlyIleValVal
GluTyrThrGlyThrProThrProLeuArgGlnLeuAlaSer
ValThrValGluAspSerArgThrLeuLysIleAsnValPhe
AspArgSerMetSerProAlaValGluLysAlaIleMetAla
SerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspIle
ArgValProLeuProProLeuThrGluGluArgArgLysAsp
LeuThrLysIleValArgGlyGluAlaGluGlnAlaArgVal
AlaValArgAsnValArgArgAlaAsnAspLysValLys
AlaLeuLeuLysAspLysGluIleSerGluAspAspAspArg

GATCTGACCAAAATCGTTGGTGGAAGCAGAACAGCCGCT
GTTGCTACTACGTAACTCGCTCGCTGACCGCAACCAAGAGTG
AAAGCACTGTTGAAGAGATAAGAGATCAGCGAAGCAGCGAT
CCCGCTTCTCAGCAGCATGACAGAAATGACTGATGCTGCA
ATCAGAAAATTCAGACGCCCTCGGCAGACAGAAAGACAGAA
CTCATGCACTTCTGA

である新規DNA。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明のペプチド(BRF)は、大腸菌における蛋白合成過程において、リボゾームのaRFaからの脱離を促進するペプチドであり、生体外でのペプチド合成を工業的に行う際に、その重要性が期待できるものである。

〔従来の技術および課題〕

従来、その存在と機能については、本発明者等が報告していた(Biochemistry, 11, 4037-4044(1972))が、BRFを大量に生産せしめた例はなく、その選択的大量生産が求められていた。

〔課題を解決するための手段〕

ArgSerGlnAspAspValGlnLysLeuThrAspAlaAlaIle
LysLysIleGluAlaAlaLeuAlaAspLysGluAlaGluLeu
MetGlnPhe

からなる新規ペプチドおよびその構造遺伝子ならびに製造方法である。

上述した本発明のペプチドアミノ酸配列および以下の説明においては、Valは、バリン、Argは、アルギニン、Serは、セリン、Thrは、スレオニン、Proは、プロリン、Lysは、リジン、Alaは、アラニン、Hisは、ヒスチジン、Asnは、アスパラギン、Glnは、グルタミン、Gluは、グルタミン酸、Glyは、グリシン、Leuは、ロイシン、Aspは、アスパラギン酸、Tyrは、チロシン、Ileは、イソロイシン、Pheは、フェニルアラニン、Cysは、システインの各残基を意味する。

本発明の新規ペプチドは、大腸菌等を用いた遺伝子組換え法により、容易に大量生産できるという特徴を有しているので、遺伝子組換え法により生産するのが好ましい。

以下に、本発明の新規ペプチドの製造方法につ

いて、説明する。

1) 構造遺伝子の入手

本発明のペプチドの構造遺伝子を例えばグリーンライブラリー例えば、ClarkとCarboxの遺伝子バンク(Cell, 9, 91-99(1978))より、適当なブロープを用いて、約取するのが好ましい。特に、本発明者は、RRFの遺伝子が大幅面のF膜毛接合時の2から6分領域に存在することを確認しており、この部分の遺伝子バンクより約取することが特に好ましい。

2) 発現ベクターの調製

本発明においてはその発現のためのプロモーター等の発現システムを有し、大幅面内で増殖可能なさまざまなプラスミドを用いることが可能であり、それらのプラスミドを調製するにあたっては、公知の常法に従って行うことができるが、市販の発現プラスミドを利用することも可能である。

これらのプラスミドに前記の本発明のペプチドの構造遺伝子を含むDNAを一般の遺伝子組換えの操作によって組み込むことにより、プラスミド組換

以下、本発明について、実施例を示し、説明する。

【実施例】

1. RRFcDNAを含むプラスミドの単離

本発明者等の報告(Biochemistry, 11, 4037-4044(1972))、約取したポリゾームを用いたRRF活性のアッセイ方法を指標として、E. coli WRE600株のリゾゾーム洗浄液より本発明者等の報告

(Biochemistry, 11, 4037-4044(1972))した精製方法でRRF蛋白を精製し、NaDodSo₄を含有するポリアクリルアミドゲル電気泳動により、その純度を確かめた。精製したRRF蛋白 480μgをBrCN 420msとを室温、避光下で、80%酸 50μg中で24時間反応させた。この反応を450μgの精製水を加えて停止せしめ、凍結乾燥後、再度0.1%トリフロ酢酸含有 8M 尿素水溶液 50μgに溶解し、セファデックスC50カラムに付し、0.1%トリフロ酢酸で溶出して、2種のフラクションを得、それぞれ、凍結乾燥し、アミノ酸配列分析に供した。これを、プロテインシーケンサ(アブライダイオシ

ス分子を構築する。

3) 組換え体の作成

常法にしたがい、この組み換え分子を用いて適当な大腸菌株を形質転換し、形質転換体を得る。

4) ペプチドの生産

形質転換体の培養に当たっては、L-増地、W増地、W9-カザミノ酸増地、高リン酸増地、高リン酸-カザミノ酸増地等を用いることができ、これらにおける増地により本発明のペプチドを量産することができる。

5) ペプチドの精製

大幅面で発現したペプチドは、大幅面を超音波破砕後、遠心分離することによって、水溶性成分としての上清を得、これにポリエチレンイミン等を加え、DNA、RNA、リゾゾームを沈降させて除去し、遠心分離して上清を得る。この上清より、膜交換の手法を用い、粗分画を集め、更に透析、陰イオンクロマトグラフィー等を行い精製できる。

更に純度を上げるため、特異抗体を用いたアブイニティークロマトグラフに付すのも好ましい。

システム 470A) に付し、一方のフラクションの8M シークエンサ、AlaSerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspLeuArgValProLeuProProLeuであることを確かめ、DNA合成機(アブライダイオシシステム社製)により大幅面の利用コドンより規定した3'-TACCGCAGACTGGACCCAGACTTGGCTTGGCAGCCCCAAGACTGTA(47塩基)を合成し、RRF遺伝子のブロープとし、5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼ及び(r³²P)ATPを用いて³²Pラベルした。

ClarkとCarboxの遺伝子バンク(Cell, 9, 91-99)の内、0-10分領域から20クローンを選抜し、アルカリ融解を用いたミニプレベレーション法

(Maniatis T.他, Molecular cloning(1982))でそれぞれのプラスミドを得た。サザンハイブリダイズ法(Southern E. M., J. Mol. Biol., 98, 503-517(1975))に従い、このプラスミドをアガロースゲルよりHYBRASEに移し、プレハイブリダイズした後、5×Denhart's液、0.5% NaDodSO₄、100μg/ml 酵母 tRNA、前述の合成ブロープ(47塩基)(0.6×10⁶ cpm/3.3μg)を含有する6×SSPE(1×SSPE:0.18M

NaCl, 0.04M リン酸ナトリウム(pH 7.7), 1mM EDTA) 溶液 2ml 中で、37℃、20時間ハイブリダイズした後、1% NaDodSO₄を含むする1×SSPE溶液で洗浄した結果、プラスミドpLC6-32にRRF遺伝子が存在することを確認し、制限酵素EcoRIで消化して2.2kbの遺伝子フラグメントを回収した。このフラグメントには、RRFの開始コドンから終止コドンまで(558塩基)が完全に含まれていた。

2. 遺伝子の発現

pLC 6-32を有するE.coli JA 200をワリシン 1 unit/mlを含むする1.5mlのL-培地で通常期まで培養した。Maniatisの方法(Molecular cloning (1982))でこの大腸菌よりプラスミドを抽出し、このプラスミドを10mM トリス塩酸(pH 8.0)、1mM EDTAからなる溶液100μlに2.5 ODとなるように溶解し、この溶液よりプラスミド2.0 OD相当量を取り、EcoRI 50 unitと混合し、BRLマニユール記載の反応液100μl中で37℃、3時間反応させ、500 mM EDTA10μlをくわえて、反応終了後、0.3%酢酸

更に、上記の2.2kbのフラグメントのうちのSmaIおよびEcoRI消化フラグメント(0.9kb)を同様にpUC19ベクターにライゲーションしてトランスフォームした場合は、大腸菌の総蛋白の90%以上がRRFであった。

これらの大腸菌の抽出液のRRF活性を測定したところ、通常の大腸菌に比べ圧倒的に高いRRF活性が認められた。

3. RRFの精製

この固体産より、本発明者等の報告(Biochemistry, 11, 4037-4044(1972))したポリゾームを用いたRRF活性のアッセイ方法を指標として、DH5a/pRR1の固体抽出液より、本発明者等の報告(Biochemistry, 11, 4037-4044(1972))した精製方法でRRF蛋白(分子重量20,000ダルトン)を精製した。

4. DSAシークエンスの解析

また、pRR1を制限酵素EcoRI、SmaI、SmaIお

ナトリウム存在下、2倍量のエタノールでDNAを沈降させた。このDNAを1.2% アガロースゲル電気泳動に付し、2.2kbのフラグメントを得た。Dunaleらのゲル内ライゲーション法(Biotechniques, 5, 62-67(1987))により、このフラグメントとあらかじめEcoRI消化し、中smallホスファターゼで処理したpUC 19ベクターをライゲーションし、このライゲーション混合物10μlをE.coli DH5a 50μlにトランスフォームし、50μg/ml アンピシリン、2% X-Gal 50μlを含むするL-培地プレートに塗いた。白色のコロニーとして、プラスミドを含む菌を陽、これらのうちから、ザゲン法により、pUC 19にRRFの遺伝子を含む2.2kbのプラスミドの組み込まれたプラスミド(pRR1)を含む菌(DH5a/pRR1)を得た。この菌を培養し、Caskerの方法(J. Bacteriol., 158, 365-368(1984))で調製した菌体分解物の総蛋白をSDS電気泳動に付し、ゲルをクマシブルー染色し、Bradfordの方法(Kiel, Biochem., 72, 248-254)で定量した。ここで、大腸菌の総蛋白の10%以上がRRFであった。

よびBclIで消化してえられたフラグメントについてリデオキシ法によりDNAシークエンス分析を行ったところ、RRFの開始コドンから終止コドンまでのDNAシークエンスは、

5'-CTGATTACCGATATCAGAAAGATGCTGCAACTACCGCATG
GACAAATGCGTAGAAGCGCTTCAAAACCCAAATCAGCAAAATA
CGCAGCGGCTGCTGCTTCTCCCAAGCGCTGCTGATGCGATTGCTG
GTGCAATATTACGGCAGCCGCGCCGCTGCTGCTGCTGCTGCA
AGCGTAACCGTAGAAGATTCCCGCTACACTGAAATCAACCTG
TTTGATCGTTCAATGCTCTCCGCGCTTGAAAAAAGCGATTATG
CGCTCGCATCTTGGCGCTGAACCGCAACTCTCGCGCGTAGCGAC
ATCCGTGTTCCGCTGCCCGCGCTGACGGAAGAACGCTGCTAAA
GATCTGACCAAAATCGTTCTGCTGCAAGCAGAAACAGCGCGT
GTTCGCTACGTAACGTCGCTGCTGACGCGAAGCAGCAAGATG
AAACCGACTGTGAAAGATAAGACGAACTCTCGCGCGTAGCGAT
CGCCGTCTCAGGACGATGACGAAACTGACTGCTGCTGCA
ATCAAGAAAATTGAAGCGCGCTGCCAGACAAAGACAGACAA
CTGATCGCACTTCTGA

の(558塩基)であり、そのDNAシークエンスに対応するアミノ酸シークエンスは、

MetIleSerAspIleArgLysAspAlaGluValArgMetAsp
 LysCysValGluAlaPheLysThrGlnIleSerLysIleArg
 ThrGlyArgAlaSerProSerLeuLeuAspClyIleValVal
 GluTyrTyrGlyThrProThrProLeuArgGlnLeuAlaSer
 ValThrValGluAspSerArgThrLeuLysIleAsnValPhe
 AspArgSerMetSerProAlaValGluLysAlaIleMetAla
 SerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspIle
 ArgValProLeuProProLeuThrGluGluArgArgLysAsp
 LeuThrLysIleValArgGlyGluAlaGluGlnAlaArgVal
 AlaValArgAsnValArgArgAspAlaAsnAspLysValLys
 AlaLeuLeuLysAspLysGluIleSerGluAspAspAspArg
 ArgSerGlnAspAspValGlnLysLeuThrAspAlaAlaIle
 LysLysIleGluAlaAlaLeuAlaAspLysGluAlaGluLeu
 MetGlnPhe

であり、185アミノ酸、分子量20,639であるこ
 とが確認され、上記で得られた蛋白に対応するも
 のであった。